

Stressfrakturer hos den elitidrottande hästen

Potentiella benmarkörer för diagnos och prevention

Anna Pettersson



Stressfrakturer hos den elitidrottande hästen Potentiella biomarkörer för diagnos och prevention

Stress fractures in the equine athlete Potential biomarkers in diagnosis and prevention

Anna Pettersson

Handledare: Stina Ekman, institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Examinator: Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Kandidatarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurskod: EX0700

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Omslagsbild: Anna Pettersson

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen / Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsvetenskap

Delnummer i serie: 2015:53

Nyckelord: katastrofskada, stressfraktur, kapplöpningshäst, elitidrottande häst, fullbod, benmarkör,
träning, muskuloskeletal markör

Key words: catastrophic bone injury, stress fracture, race horse, equine athlete, Thoroughbred, bone
marker, exercise, musculoskeletal marker

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsvetenskap

INNEHÅLL

| | |
|--|----|
| Sammanfattning | 1 |
| Summary | 2 |
| Inledning..... | 3 |
| Bakgrund | 3 |
| Problemformulering | 3 |
| Syfte och frågeställningar..... | 3 |
| Material och metoder..... | 3 |
| Val av metod | 3 |
| Avgränsningar | 4 |
| Litteraturoversikt..... | 4 |
| Benvävnad..... | 4 |
| Egenskaper och homeostas..... | 4 |
| Funktionell adaptation till belastning | 5 |
| Fullblodet som kapplöpningshäst | 5 |
| Stressfrakturer | 6 |
| Definition | 6 |
| Prevalens | 6 |
| Patogenes..... | 7 |
| Riskfaktorer | 7 |
| Diagnostik | 8 |
| Biologiska markörer | 8 |
| Definition | 8 |
| Markörer i benvävnad | 9 |
| Användning och potential | 10 |
| Diskussion | 11 |
| Metoddiskussion..... | 11 |
| Resultatdiskussion..... | 11 |
| Sammanfattning | 13 |
| Referenser..... | 14 |

SAMMANFATTNING

Muskuloskeletal skador är ett stort problem hos hästar som tränas och tävlas i kapplöpning, och orsakar smärta med påföljande hälta för individen och ger även ekonomiska förluster inom industrin. Av dessa är stressfrakturer i tredje metakarpalbenet distalt på frambenet vanligast och utgången är ofta katastrofal med avslut på karriären och i vissa fall slakt. För denna typ av skada finns alltid en preexisterande patologi i benvävnaden. Träningen är högintensiv och kräver en fysisk adaptation av rörelseapparaten. Den kraftiga mekaniska belastningen kan kopplas till predilektionsplatser för frakturerna, där mikroskador i benvävnad utvecklas till fullständiga frakturer. Stressfrakturernas bakgrund är multifaktoriell med flera riskfaktorer. Trots den höga prevalensen, kunskaper om riskfaktorer och allvarlighetsgraden i skadan finns inte säkra metoder för att påvisa vilka hästar som ligger i riskzonen att drabbas. Detta gäller även för stressfrakturer hos humana elitidrottare.

Biologiska markörer är substanser i kroppsvätskor som kan användas som indikatorer för benmetabolismen och har karaktärsdrag som gör dem objektivt mätbara. Benspecifika markörer är framförallt sådana som påvisar aktiviteten hos osteoblaster och osteoklaster, vilka indikerar formation och resorption. Markörerna speglar momentana eller dynamiska förändringar och i och med den detaljerade molekylära karakteriseringen av benvävnad har potentiella markörer diskuterats så som; osteoprotegrin (OPG) med en viktig roll i aktiveringen av osteoklaster och således benresorption, bone sialo protein (BSP) som är inblandad i benbildning- och tillväxt samt nyckelproteiner ingående i Wnt-signaleringsvägen med en viktig roll i utvecklingen av benvävnad. Dessa har i flera studier visat sig kunna vara potentiella markörer för benpatologi och skulle då kunna användas för screening av individer i riskzonen. Problemet med dessa markörer är att de vid normal benmetabolism varierar i koncentration och svårigheten är att avgöra när benpatologi uppstår istället för fysiologisk adaptation.

Det finns ett stort behov av att utveckla kliniskt användbara diagnostiska metoder för att identifiera individer med risk att drabbas av stressfrakturer.

SUMMARY

Musculoskeletal injuries in race horses cause pain and subsequent lameness in the horse, with loss of performance and hence it will also affect the racing industry. Stress fractures of the third metacarpal bone are a common cause of catastrophic fractures in the racing horse. This will always end the horse's racing career and often result in euthanasia. Stress fractures are only seen in bones with a pre-existing pathology. Training and competing on top level is highly intensive and demands a physical adaptation of the bone tissue to prevent injuries. The predilection sites are associated to the a high dynamic load which cause subchondral bone sclerosis as well as micro destruction of the bone that easily can progress to a complete fracture. The cause of stress fractures is multifactorial with several risk factors, including a genetic influence. Despite the high prevalence of these injuries, there are no well-developed diagnostic markers to identify horses, or human athletes, at risk in order to prevent catastrophic injuries due to stress fractures.

Diagnostic biological markers can be used as indicators of normal and abnormal processes in the body. Bone specific markers are especially those who show osteoblastic and osteoclastic activity, e.g. bone formation and resorption. The potential bone markers reflect bone metabolism, but cannot differ between normal remodeling and pathology. A perfect marker would differentiate between normal remodeling and a tissue at risk for a stress fracture. There are potential markers that have been investigated such as: osteoprotegerin (OPG) with an important role in activation of the osteoclasts and thereby bone resorption, bone sialo protein (BSP) involved in bone formation and growth and key proteins in the Wnt-signaling that have a considerable role in the development of bone tissue. These markers have in several studies been suggested as potential bone markers for bone pathology and may be useful in screening individuals in risk for bone pathology. Today there is a need for diagnostic biomarkers to identify individuals at risk for stress fractures and subsequent prevent catastrophic fractures in equine athletes.

INLEDNING

Bakgrund

Stressrelaterade skador i benvävnad har en bakomliggande patologi och kan oidentifierade orsaka frakturer (Firth *et al*, 2009; McKinnon *et al*, 2014). Stressfrakturer uppkommer akut och är den vanligaste muskuloskeletala skadan hos kapplöpningsfullblod varvid den intensiva fysiska aktiviteten de utsätts för starkt kopplas till patogenesen (Radkte *et al*, 2003; Stover, 2003). Stressfrakturer är även funna hos hund och människa (Khan *et al*, 1995; Loucks, 2008; Matheson *et al*, 1987; Milgrom *et al*, 1985). Predilektionsplatserna är kopplade till lokaliseringen för hög belastning och hos kapplöpningshästen handlar det främst om tredje metakarpalbenet i den distala delen av hästens framben (Goodship & Smith, 2004; Sjaastad *et al*, 2012). Skadan diagnosticeras med hjälp av kliniska symptom tillsammans med någon form av bilddiagnostik (Davidson & Ross, 2003). Prognosen för hästar som drabbas är dålig, varför ett stort behov finns av metoder för att tidigt kunna förutse risken för individen att utveckla benpatologi som innebär en ökad frakturrisk.

Problemformulering

Skadeprevalensen inom kapplöpningsindustrin är hög och såväl hästarna som ekonomin i branschen drabbas hårt (Davidson & Ross, 2003; Dubois *et al*, 2014). Det finns idag ingen metod för att kliniskt förutse frakturrisk men mycket att vinna på utveckling av effektiva, icke-invasiva metoder för att övervaka skelettets utveckling och homostas vid intensiv träning för att förhindra stressfrakturer hos ekvina elitidrottare (Goodship & Smith, 2004). En kliniskt användbar metod för screening behövs så att individer i riskzonen för frakturer kan identifieras. Forskning för att identifiera biologiska markörer avseende benmetabolismen och dess potential som biomarkörer är viktig. Upptäcks individer i riskzonen skulle stressfrakturer troligen kunna undvikas (Estrada *et al*, 2012; Thorfve, 2014).

Syfte och frågeställningar

Syftet med detta arbete är att få fördjupad kunskap kring patologin vid stressfraktur hos den elitidrottande hästen och hur potentiella benmarkörer kan användas för preventiva och diagnostiska åtgärder.

Aktuellt syfte dissekterades i följande frågeställningar:

- Vad är en stressfraktur?
- Kan biologiska markörer för ben vara tänkbara som indikatorer för en ökad risk för stressfraktur?
- Vilken potential har utvalda benmarkörer, det vill säga finns det vetenskapliga hållpunkter för någon relevant biologisk benmarkör idag?

MATERIAL OCH METODER

Val av metod

En litteraturstudie ligger till grund för arbetet. Framförallt användes vetenskapliga artiklar från de elektroniska databaserna PubMed och Web of Science, men även kurslitteratur ingår.

Aktuella sökord var *catastrophic bone injury, stress fracture, race horse, equine athlete, Thoroughbred, bone markers, exercise, musculoskeletal marker*. Även referenser i funna vetenskapliga artiklar inom området har använts för att bredda sökandet.

Avgränsningar

Litteraturstudien begränsas till att gälla hästar av fullblodstyp som tävlar kapplöpning. Detta eftersom det största problemet med stressfrakturer föreligger hos denna grupp.

En begränsning av antalet potentiella benmarkörer har gjorts till de mest vetenskapligt studerade.

LITTERATURÖVERSIKT

Benvävnad

Egenskaper och homeostas

Kroppens skelett har många funktioner vilka innefattar att vara ramverk och hävarm för rörelseapparaten, skydd för inre organ samt en mineraldepå (Sjaastad *et al*, 2012). Benvävnad består av celler (osteoblaster, osteocyter och osteoklaster) och extracellulärt matrix (ECM). ECM består av kollagen typ 1, ansvarigt för draghållfasthet samt grundsubstans, med elastisk potential och som utgörs av vatten, proteoglykaner, glukosaminoglykanor, proteiner och lipider. ECM kommer att mineraliseras och bilda hydroxyapatit bestående av kalcium, fosfor, karbonat och zink som deponeras i utbyte mot vatten. Mineraliseringen ger benet dess hårdhet, och variation i benets egenskaper (både hårt och elastiskt) är till stor del beroende av mineraliseringsgraden.

Bildning av benvävnad sker både pre- och postnatalet genom ett balanserat samarbete mellan cellerna i vävnaden (Sjaastad *et al*, 2012). När denna är klar kan man makroskopiskt skilja mellan två olika typer av struktur i benet; dels kortikal struktur (80 % av skelettet) som finns ytterst på alla ben samt subkondralt (under ledbrösket) och dels trabekulär (spongiöstisk) struktur som finns mer centralt i benet (ibid; Movéare-Skrtic *et al*, 2014). Benbildande celler - osteoblaster - finns på benets yta i omogen form redo att aktiveras av mekaniska (belastning) och biologiska (TGF- β eller β -katenin) signaler. Osteocyter är den del av mogna osteoblaster som omgivs helt av ECM. Osteocyterna har färre organeller i sin cytoplasma och mindre endoplasmatiskt retikel jämfört med osteoblasterna och ger via sina långa cytoplasmautskott i canaliculi upphov till en cell-cellkontakt som tillåter kommunikation mellan både osteoblaster, osteocyter och osteoprogenitorceller samt passage av näringsämnen (Zachary & McGavin, 2012). Osteoklasten är flerkärnig och härstammar från cirkulerande monocytter och är aktiverade på benets yta där de ansvarar för benresorptionen genom att frisätta proteolytiska enzymer (exempelvis metalloproteinaser och katepsin K) och organiska syror (laktat och citronsyra).

Interaktionen mellan celltyperna ger möjlighet till modellering och remodelering av benvävnad (ibid). Modellering är en förändring av benets form och/eller storlek och styrs av tillväxt under mekanisk belastning (Stover, 2003). Remodellering är en koordinerad, strikt ersättning av gammal benvävnad lokalt med ny och sker i upp till 15 % av benvävnaden varje

är genom samverkan mellan celltyperna (Price, 2011). Under tillväxt sker remodelleringen i hela kroppen medan den hos vuxna djur är en lokal process som svar på mekanisk belastning. Remodellering startar med en rekrytering av osteoklaster som fäster till benytan och en resorptionhåla bildas som aktiva osteoblaster kan fylla med nytt matrix. Osteoblasterna är centrala i processen då de aktiverar osteoklasterna genom att uttrycka och sekretera ”nuclear factor κ B-ligand” (RANKL - ”osteoclast differentiation factor”, ODF) som binder till en receptor på osteoklastprecursorer (RANK), vilket ger en intracellulär kaskadreaktion som slutar i differentiering till en aktiv osteoklast (Goodship & Smith, 2004). Som en motsatt funktion kan osteoblasten bilda en RANKL-homolog; osteoprotegrin (OPG) som kan binda till RANK på osteoklasten och därmed förhindra bindningen av RANKL vilket gör att osteoklastprecursorn inte aktiveras. Även Wnt-signaleringsvägen har en viktig del i benhomeostasen (Zheng *et al*, 2012).

Funktionell adaptation till belastning

Kroppen har en biologisk drift att vid rörelse minska energikostnaderna och genomgå strukturella förändringar i leder, muskler och skelett så att belastningen (kraft per yta) kan hanteras utan uppkomst av skada (Zachary & McGavin, 2012).

Benvävnad har en hög metabolisk aktivitet för att snabbt kunna svara på fysiologiska och biokemiska krav som deformerar vävnaden (ibid). Detta ger biologiska signaler som inducerar bencellsaktivering. Benets försvar mot mekaniska krafter såsom fysiskt arbete bestäms av kapaciteten att modellera och remodellera för att adaptera till kraftförändringar och reparera mikroskador som uppkommer vid en ökad belastning (Price, 2011). Remodellering sker i kortikalt ben och är relaterad till kraftökning vid träning inför kapplöpning och processen kallas därför funktionell adaptation (Movéare-Skrtic *et al*, 2014). Skada uppkommer när remodelleringen inte hinner reparera uppkomna mikrosprickor (Zachary & McGavin, 2012). Således sker en minskning av benmassa, vilket också kan ske vid systemisk sjukdom eller onormalt låg belastning. Ben som remodelleras kommer till en början att vara mer poröst vilket är en normal bild hos yngre, växande individer men kan tyda på patologi hos en vuxen individ.

Studier *in vivo* har visat att trabekulärt ben blir tjockare och att benbildning sker på flera platser vid upprepad cyklisk belastning (Martig *et al*, 2013; Ramzan & Palmer, 2011). Vidare sågs att hästar som tränats hårt och sedan får en period av vila visade sänkt bendensitet och därmed en ökad porösitet i vissa utsatta ben, bland annat i tredje metakarpalbenet.

Hos tränade hästar är tjocklek och densitet i trabekulärt ben en reflektion av hur mycket av belastningen fördelas på den aktuella ytan (Goodship & Smith, 2004). Exempelvis är dorsala delar på metakarpalbenen tjockare än de palmara delarna av samma ben, vilket tyder på en platsspecifik funktionell adaptation som kan indikera predilektionsställen för vissa skador.

Fullblodet som kapplöpningshäst

Träning och tävling för kapplöpning sker under höga hastigheter och fullblodet räknas som elitidrottare (Verheyen *et al*, 2009). Tävlingslopp förekommer för hästar från två års ålder vilket kräver träning av unga individer. Traditionellt tränas hästarna högintensivt under korta

perioder vilket medför en hög belastning utan tid för fysisk adaptation, särskilt för en ung individ. Träning och tävling bidrar starkt till uppkomst av muskuloskeletal skador specifika för populationen (Gaschen & Burba, 2012).

Skadorna är av varierande svårighetsgrad (ibid). Prevalensen fatala skador är låg men andelen skador som ger hälta är hög. En stor del av skadorna involverar benvävnad med stressrelaterade frakturer som den främsta benrelaterade patologin, orsakade av en repetitiv överbelastning av vävnaden (Dubois *et al*, 2014; Frisbie *et al*, 2010, Martig *et al*, 2013; Radtke *et al*, 2003; Powell, 2012; Verheyen *et al*, 2009). Stressrelaterade benskadorna är vanligast i metakarpal- och metatarsalbenen men förekommer också i tibia, humerus, pelvis och scapula. Prognosen varierar beroende på lokalisering men de flesta distala frakturer hos häst har dålig prognos (Dyson, 2014). En skada av katastrofkaraktär kommer definitivt avsluta hästens atletiska karriär samt kräver i många fall en extensiv behandling för att rädda individens liv (MacKinnon *et al*, 2014).

En förståelse av patobiologin och benvävnadens egenskaper krävs för att kunna bestämma ålder för träning och träningsupplägg för att minimera risken för skador (Goodship & Smith, 2004). Fullbloden är som grupp tillräckligt homogen för studier avseende uppkomst av mikroskador i den subkondrala benvävnaden som i förlängningen kan ge allvarlig påverkan i rörelseapparaten (Verheyen *et al*, 2009).

Stressfrakturer

Definition

En stressrelaterad skada i benvävnad uppträder plötsligt och utan ett specifikt trauma varvid den kan benämnas som ”spontan fraktur” (Davidson & Ross, 2003; Firth *et al*, 2009).

Grundorsaken till skadan är en uttrötning av benvävnaden i och kring frakturen.

En stressinducerad skada av benvävnad som inte upptäcks i tid kan ge upphov till en katastroffraktur (MacKinnon *et al*, 2014). Denna typ av skada uppkommer akut men ses som ett kroniskt sjukdomsutvecklingsförlopp.

Prevalens

Stressfrakturer ses hos unga till synes friska hästar som genomgår intensiv fysisk träning (Radtke *et al*, 2003; Stover, 2003). Det är den vanligaste muskuloskeletal skadan hos fullblodshästar som tränar och tävlas för kapplöpning. Metakarpala frakturer står för 25 % av alla katastrofskador hos fullblod i Kalifornien och Storbritannien, ibland med fatal utgång. Yngre hästar (under 3 år) har en större tendens att utveckla fullständiga kondylära frakturer på metakarpalbenen jämfört med äldre hästar. Remodelleringen minskar kraftigt under träning hos individer mellan två och fyra års ålder vilket tyder på en mer begränsad förmåga till adaptation (Radtke *et al*, 2003; Ramzan & Palmer, 2011), vid träning i unga år. Fullblod har en större risk att utveckla distala frakturer under sitt första tävlingsår än senare samt efter sitt femte tävlingsår då nettosamlingen av benpatologi är stor (Martig *et al*, 2013). Andelen stressfrakturer sett till alla åldrar är högre hos valacker än hingstar vilket kopplas till att valacker tävlas länge eftersom de saknar avelsvärde och ackumulationen av mikroskador kan då öka (Ramzan & Palmer, 2011).

Stressfrakturer finns även hos andra arter, bland annat hos Greyhounds som används i kapplöpning (Goodship & Smith, 2004). På humansidan har skadorna påvisats hos militärrekryter, balettdansöser och elitidrottande löpare (Khan *et al*, 1995; Matheson *et al*, 1987; Milgrom *et al*, 1985). Man har även sett ett växande problem med stressfrakturer hos kvinnliga idrottare i en korrelation mellan stört ätbeteende, amenorré och osteoporos vilket slås samman i ett fenomen kallat ”den kvinnliga idrottstriaden” (Loucks, 2008).

Patogenes

Grunden till metakarpala stressfrakturer orsakas av hög belastning införd snabbt (Goodship & Smith, 2004). Höghastighetsträning ger kompressionskrafter framförallt på hästens främre distala extremiteter och en upprepad cyklisk belastning ger en funktionell adaptation (remodellering) i området (Martig *et al*, 2013). Effekten blir en ökad kortikal tjocklek och ökad benvävnadsvolym som ger en minskad elasticitet och styrka i benet (MacKinnon *et al*, 2014). Den intensiva fysiska aktiviteten vid träning och tävling ger en samtida muskeluttrötning vilket minskar musklernas förmåga att lagra energi och neutralisera den stress som läggs på benen. Benvävnaden kommer därför utsättas för högre krafter än det är adapterat för. Detta ger en stress, ökad kraft per yta, på benet (Sjaastad *et al*, 2012). Repetitiv stress ger upphov till otillräcklig adaptation i benvävnaden eftersom balansen mellan formation och resorption ändras, och mikroskopiska skador kommer ackumuleras på platser där stressen koncentreras. Detta sker bland annat i subkondralt ben i tredje metakarpalbenet och dessa inkompleta frakturer kan utan förvarning utvecklas till fullständiga spontana frakturer under träning eller tävling (Martig *et al*, 2013). Frakturer anses uppstå på grund av få repetitioner under hög belastning eller frekventa repetitioner under lägre belastning. När benreparationen släpar efter kan mikrosprickor utvecklas till makrofrakturer, vilket kan ske mellan sex veckor och ett år efter att benpatologin påbörjats (Radtke *et al*, 2003). Minskad porositet i benvävnad som försvårar dess förmåga att absorbera energi kommer dessutom att lägga mer belastning på ledbrösket. Denna typ av utmattningsrelaterade skador på benvävnaden kan ge ledbröskfibrillering, förlust av ledbrösk (sår), synovit och osteokondral fragmentation (Radtke *et al*, 2003).

Riskfaktorer

Flera faktorer med direkt eller indirekt påverkan deltar i utvecklingen av stressfrakturer men en preexisterande patologi finns alltid med (MacKinnon *et al*, 2014; Stover, 2003). Den multifaktoriella bakgrunden gör att det inte går att koppla riskfaktorer enbart till hästens ålder, tävlingskarriärens längd eller antalet starter i tävlingslopp. Riskfaktorerna involverar även kroppsammansättning (både för människa och för häst eftersom den anatomiska positionen av benen påverkar belastningsläget), kön (vanligare hos hästar av hanligt kön, troligtvis på grund av mer muskelmassa) samt en maternell koppling (föl födda av äldre mödrar har en högre risk att drabbas) (Loucks, 2008; Stover, 2003; Zachary & McGavin, 2012). Dessutom finns en veterinärmedicinsk del eftersom behandling med smärtstillande medel av outredd ledsmärta gör att cyklisk belastning kan fortgå varvid bennedbrytningen fortsätter och risken för stressfraktur ökar.

Viktigaste riskfaktorn för kapplöpningshästen är det arbete den utsätts med snabbt insatt hög belastning hos unga individer (Stover, 2003). Hästarna är mer mottagliga för skador i vissa

åldrar, och träningsbakgrunden (hög ackumulerad hastighet samt distans) påverkar starkt uppkomsten av stressfrakturer. Dock behövs mer studier, framförallt epidemiologiska, för att visa sambandet mellan träningsmetod och frakturrisk (MacKinnon *et al*, 2014). Det finns även en genetisk komponent eftersom utmattning av benvävnad påverkas av individuella skillnader i porösitet, mineralisering och orientering (Ramzan & Palmer, 2011). En studie av Firth (2009) visade förändringar i den mineraliserade vävnaden vid platsen där en stressfraktur uppstår redan innan träningen börjar hos det elitidrottande fullblodet.

Diagnostik

Stressfrakturer är svåra att diagnostisera och skadans allvarlighetsgrad avgör hur akuta de kliniska symptomen är (Davidson & Ross, 2003). Alla grader av hälta kan finnas och smärta i subkondralt ben i tidig patogenes ger inga tydliga symptom. Därför är resultat från kliniska undersökningar inkonsekventa och måste kombineras med en bekräftande bilddiagnostisk undersökning (MacKinnon *et al*, 2011).

Radiologisk undersökning är ett viktigt verktyg i diagnosticeringen men har begränsningar och fordrar specifika projektioner för att påvisa frakturlinjerna (Davidson & Ross, 2003). Metoden är opålitlig för akuta skador i metakarpalbenet och andra mer subtila subkondrala benskador eftersom synlig patologi sällan motsvarar graden av hälta (Gaschen & Burba, 2012; Powell, 2012). Ultraljud är användbart för att diagnostisera stressfrakturer i områden där vanlig radiografi inte är möjlig att genomföra men är mest användbart vid skador i mjukdelar såsom senor och ligament. Stående magnetröntgen kan detektera ett bredare spektrum av sjukdom i benvävnad genom att påvisa både adaptiva och nonadaptiva remodeleringsprocesser i benvävnad hos kapplöpningshästar som inte syns på radiografi. Kärnscintigrafi (injektion av en radioaktiv isotop med vävnadsaffinitet) är den mest använda metoden för att påvisa stressfrakturer hos häst (Davidson & Ross, 2003; MacKinnon *et al*, 2014). Metoden har hög känslighet för att identifiera träningsinducerad remodelering och kan användas om misstanke finns trots att radiologisk eller klinisk undersökning är negativ. Scintigrafisk undersökning är tyvärr kostsam, men en bra metod för att diagnosticera stressfrakturer, stressorsakad remodelering eller subkondral benaktivitet.

Biologiska markörer

Definition

En biologisk markör (biomarkör) är en substans som används som en indirekt indikator på en normal eller abnormal process i kroppen (Frisbie *et al*, 2010). En biomarkör har karaktärsdrag som gör den objektivt mätbar och kan därför användas för diagnosticering, följa progression av sjukdom alternativt utvärdera farmakologiskt behandlingssvar.

Biomarkörer kan ge specifik information om katabola eller anabola processer och molekyler kommer från vävnadsmetabolism i brosk, synovialmembran och subkondralt ben (Allen *et al*, 2003). Detta ger möjlighet att detektera processer som kan kopplas samman med senare sjukdomstillstånd. Användbara biomarkörer ska kunna mätas i kroppsvätskor genom en känslig och specifik metod (Price, 2011). De bör dessutom vara vävnadsspecifika och man bör känna till de faktorer som påverkar dess syntes och metabolism för att kunna förstå deras variabilitet.

Markörer i benvävnad

Homeostasen mellan processer i benvävnad ändras vid patologiska tillstånd och biomarkörerna klassificeras därför efter markörer för benformation respektive benresorption (Price, 2011). Markörerna finns i serum, plasma eller urin. Många osteoblastprodukter (såsom delar av kollagen typ 1) går att mäta men är inte specifika för benvävnad utan fås i höga nivåer även vid exempelvis senskador. Biomarkörer för benresorption representeras av produkter från benvävnaden i samband med osteoklasternas aktivitet.

Eftersom biologiska markörer styrs av momentana och dynamiska förändringar i bencellsaktivitet kan flera faktorer påverka de biologiska benmarkörerna (*ibid*). Vissa av dessa faktorer går att ta hänsyn till och påverka såsom träning, foderintag, dagsljus, och sjukdom (Goodship & Smith, 2004). Dock påverkas vissa av markörerna även av ras och ålder vilket ger svårighet vid mätning. Biologiska markörer (enzymer och organiska ämnen) är också närvarande i andra vävnader än ben och därför kan olika fysiologiska processer påverka nivåerna och troligen måste en kombination av markörer analyseras för att benvävnadsspecifika processer ska påvisas (Price, 2011). Humana studier har visat att vissa enskilda markörer såsom benspecifikt ALP (BALP) ger viktigare information än andra, och liknande samband borde finnas hos häst (Allen *et al*, 2003).

Den detaljerade molekylära karaktäriseringen av ben har lett till utvecklingen av biomarkörer med ökad specificitet, exempelvis osteoprotegrin (OPG) som har en viktig roll i osteoklastdifferentieringen (Simonet *et al*, 2003). Tidigt fann man att OPG är en viktig fysiologisk regulator i formationen av ben genom en kopplad mekanism med benresorption (Nakamura *et al*, 2003). Detta är dock inte bara en lokal aktivitet i benvävnad då RANKL och OPG även finns i ledcellerna hos häst (kondrocyter och synovicyter), vilka har visat sig kunna påverka osteoklastogenesen i intilliggande subkondrala ben (Byron *et al*, 2010). Ny forskning talar om OPGs roll i att reducera smärta och ledpatologi vid osteoartrit-liknande modeller (Sagar *et al*, 2014; Udagawa *et al*, 2000). OPG har också visat sig vara en kritisk regulator av postnatal benmassa då möss som saknar denna gen får en minskad bendensitet och även förkalkning av aorta och njurartärer (Bucay *et al*, 1998). Detta tyder på att OPG, dess signalvägar eller dess ligander kan spela en viktig roll i associationen mellan osteoporos och vaskulär förkalkning.

Bone Sialo Protein (BSP) är ett protein som uttrycks i hypertrofiska kondrocyter och påverkar migration av endoteliala celler samt kärnbildning i hydroxyapatit (Boulefour *et al*, 2014). BSP spelar en viktig roll i kinetiken i tillväxten av långa ben samt membranös och kortikal benbildning och mineralisering. Möss som saknar BSP har en mindre andel mineraliserat ben i skallben och långa rörben och dessutom en lägre bendensitet. Proteinet har en cell-matrix-bindande funktion och har visat sig finnas i högre mängder i fasen mellan brosk och nybildat ben och har därmed en potential att användas som markör för ändringar i benmetabolismen i subkondralt ben (Ekman *et al*, 2005).

Den så kallade Wnt-signaleringsvägen styr flera viktiga delar under embryonalperioden hos alla studerade djur, bland annat under skelettutvecklingen (Thorfve, 2014). Wnt är sekreterade proteiner som binder till ytreceptorer varvid kaskadreaktioner initieras från cellens utsida till

cellkärnans insida vilket resulterar i transkribering av målgener (Leucht & Helms, 2014). Wnt-signaleringsvägen är ett komplext nätverk av proteininteraktioner med multipla resultat, korskontakter och inflytande på i princip alla nivåer i cellsignaleringsvägen. Wnt-proteiner uttrycks i osteocyter, kondrocyter och benmärgsceller och får bland annat osteocyter att differentiera samt stamceller att proliferera och reglerar således benmassan, bland annat tjockleken på kortikalt ben (Movéare-Skrtic *et al*, 2014; Zheng *et al*, 2012). Tydliga samband finns mellan Wnt-signaleringsvägen och benutveckling samt dess homeostas. Wnt-signaleringsvägen har en viktig roll i såväl utveckling som metabolism i benvävnaden genom att kontrollera både benformation och benresorption. Generellt ger en låg dos av Wnt-signaleringsvägen bildning av brosk medan en hög aktivitet ger bildning av benvävnad (Thorfve, 2014). En ökning av aktiv Wnt-signaleringsvägen sker exempelvis vid påverkan av litium samt IL-1 β . Dock har inget av detta ännu haft en klinisk användning i exempelvis frakturbehandling även om det är en bra väg för att accelerera läkningen av benvävnad (ibid; Leucht & Helms, 2014). Wnt-signaleringsvägen har en essentiell roll i många patologiska processer kring benvävnad och bör vara av intresse för framtida forskning.

Användning och potential

Biomarkörer kan ge snabbare indikation på terapeutiska svar än andra metoder som idag används för progressiva sjukdomar (Allen *et al*, 2003). Biomarkörer för benvävnad har använts för att genom blod kunna övervaka svaret i benvävnaden vid olika typer av träningsrutiner, vilket är en icke-invasiv teknik för att bedöma benomsättning (Goodship & Smith, 2004). Adaptationen har studerats med hjälp av substanser från kollagen typ 1 samt andra benspecifika biprodukter och även om en normal åldersrelaterad minskning av dessa substanser finns har potentialen i metoden tidigt konstaterats. Biomarkörer kan dock vara svåra att använda kliniskt på grund av den osäkra kopplingen till exakt benpatologi (Zheng *et al*, 2012). Påverkande faktorer är svåra att kontrollera och det finns en överlappande zon i vilka nivåer som är normala och när benvävnaden blir patologiskt påverkad (Price, 2011).

En klinisk applikation för benvävnadens biomarkörer är på humansidan att studera postmenopausal osteoporos genom att analysera förlust av benvävnad för att förutse frakturrisken samt utvärdera behandling (Price, 2011). Även hos häst har biologiska biomarkörer för benvävnad studerats för att hitta rätt biomarkörer för osteoporos. Det finns många analyser men de flesta är utvecklade för humant syfte. Möjligheten finns dock att följa benvävnadens massa och struktur via exempelvis bildprojektioner. Dock krävs då långvariga förändringar för att uppnå en specifik, detekterbar nivå och flera är problematiska att genomföra på vaken häst. Redan för 10 år sedan påpekade Weisman & Markovic (2005) att flera biomarkörer för benremodellering har visat sig ha en positiv korrelation med benmineraldensitet och risken för frakturutveckling. Estrada *et al* (2012) gjorde en stor meta-analys där biomarkörer för benmineraldensitet (BMD) eftersöktes då patologin vid osteoporos innebär låg BMD. Vid denna studie identifierades 56 loci varav 32 nya, och samtliga kan bedömas som essentiella för BMD. Flera av dessa biomarkörer kopplas till RANK-RANKL-OPG-korrelationen, det vill säga differentiering av mesenchymala stamceller, endochondral benbildning samt Wnt-signaleringsvägen. En studie av Frisbie *et al* (2010) visade signifikanta skillnader i serum nivåer av biomarkörer vid muskuloskeletal skada över ett longitudinellt perspektiv. Vidare påvisades ett unikt mönster av biomarkörer inför varje skada vilket gav en klassificeringsmöjlighet.

Biomarkörer har en stor potential att användas som stöd i screeningen för muskuloskeletala sjukdomar (Price, 2011). Jämfört med exempelvis magnetröntgen (som ökar för human screening för benpatologi) är de kostnadseffektiva. De är dessutom användbara i fält på grund av enkla testmetoder och upprepningsbarhet med frekventa intervall. För att förutse frakturrisk krävs dock prospektiva studier för att hitta lämpliga referensnivåer för biologiska markörer. Detta gäller också att monitorera effekten av träning på skelettet för att utvärdera träningsformer, i ett försök att förebygga muskuloskeletala skador. Utvärderingar av biomarkörer *in vitro* har visat sig lovande för detektion men mer studier krävs för att bedöma nivåerna i klinisk ortopedisk sjukdom (Frisbie *et al*, 2010). I sin doktorsavhandling uttryckte Thorfve (2014) vikten av Wnt-signaleringsvägen i utveckling av sjukdom, och som ett attraktivt mål för att kunna återställa en obalans i signaleringen. Även Svala (2014) menar att den mest användbara applikationen för att identifiera hästar i riskzonen för att utveckla muskuloskeletala skador är genom diagnostiska biomarkörer. Dessa utvalda biomarkörer kan detektera sjukdom före irreversibel vävnadsskada och kliniska symptom uppstått.

Med utökade studier av biologiska markörer kommer förståelsen för deras funktion att öka och därmed också listan över tillgängliga markörer (Allen *et al*, 2003). Detta kommer tillsammans att utveckla användningen för biomarkörer. Biologiska markörer har tidigare varit framförallt forskningsverktyg men studier kring den kliniska användningen blir allt vanligare (Price, 2011).

DISKUSSION

Metoddiskussion

Denna uppsats hade enbart en litteraturstudie som grund och valet av källor föll på framförallt vetenskapliga artiklar men även kurslitteratur. Funna artiklar var från olika tidsperioder, vilket sågs som en fördel i detta sammanhang framförallt då spekulationer om biologiska markörers potential visat sig rapporterats mycket tidigare. Därmed känns funnen litteratur relevant för uppsatsens syfte.

Resultatdiskussion

Stressfrakturer hos häst förekommer i hög prevalens hos de djur som tränar och tävlas i kapplöpning men inte hos icke-tävlande hästar (Ramzan & Palmer, 2011; Stover, 2003; Radtke *et al*, 2003). Detta visar på ett samband mellan fysisk belastning och skadeuppkomst hos denna elitidrottande population. En stressfraktur har alltid en bakomliggande patologi med ett multifaktoriellt ursprung och flera riskfaktorer har identifierats (Goodship & Smith, 2004; Dubois *et al*, 2014; MacKinnon *et al*, 2014; Verheyen *et al*, 2009). Exempelvis har träningen av framförallt unga hästar en stor påverkan på skadefrekvensen och man bör fundera på framtida lösningar över vad som är praktiskt genomförbar prevention utefter industrins krav och traditioner jämfört med hästarnas fysiska välbefinnande. Mikrosprickor i benvävnad uppkommer trots en fysiologisk adaptation och man bör därför diskutera möjligheterna att förebygga denna typ av skada genom träningsstrategier (Sjaastad *et al*, 2012; Zachary & McGavin, 2012). Här har också veterinären en viktig roll vad gäller lindrande av ledsmärta, en potentiell förvarning för uppkommande stressfraktur (Goodship &

Smith, 2004). Smärtlindring gör att individen återgår till träning/tävling vilket ökar risken för ytterligare belastning och risk för utmattning av benvävnaden med mikrofrakturer. Motsägelsefulla uppgifter finns dock då riskfaktorerna är tydliga men en onormal vävnad i metakarpalbenen har påvisats hos fullblod trots att träningen inte hade påbörjats (Firth *et al*, 2009). Är utvecklingen av onormal benvävnad avgörande för hur hästen kan hantera den ökade belastning en elitidrottande karriär medför?

Uppkomst och prevalens av stressfrakturer är noga studerat (Davidson & Ross, 2003; Dubois *et al*, 2014; Frisbie *et al*, 2010; Gaschen & Burba, 2012; Holmes *et al*, 2014; MacKinnon *et al*, 2014; Martig *et al*, 2013; Powell, 2012; Verheyen *et al*, 2009). Symptomen (framförallt hälla) kan vara svårtolkade och diagnos och tidig detektion av stressfrakturer kräver ofta avancerad, kostsam och svårtolkad bilddiagnostik. Behandlingsformerna är begränsade eller innebär långa viloperioder, vilket ger en stor ekonomisk förlust. Man önskar därför förebygga denna typ av skador och biomarkörer har visat sig ha en potential genom att på ett icke-invasivt och kostnadseffektivt sätt kunna indikera skador på benvävnad i ett tidigt stadie (Goodship & Smith, 2004; Holmes *et al*, 2014). De används idag inte aktivt i kliniken på grund av bristande kunskap om markörernas syntes och metabolism i normal fysiologi (Davidson & Ross, 2003; Frisbie *et al*, 2010; Gaschen & Burba, 2012; Powell, 2012; Price, 2011; Thorfve, 2014). Vidare problematik med användande av biologiska markörer är att de flesta som är kända idag inte är specifika för benvävnad. Dessutom speglar biologiska markörer för benvävnad hela skelettet, medan en stressfraktur orsakad av överbelastning vid fysisk aktivitet är platsspecifik (har predilektionsställen). Hur kan vi finna markörer för dessa platser? På humansidan använder man biologiska markörer för att se på postmenopausal osteoporos, både för screening och för behandlingseffekter. Om man vet när och hur ben går från fysiologisk adaptation vid belastning till en mer patologisk bild, kan man då överföra detta verktyg till stressfrakturer?

Potential som markörer för obalans i benvävnadens homeostas har påvisats hos benproteinerna OPG, BSP och proteiner tillhörande Wnt-signaleringsvägen (Boulefont *et al*, 2014; Ekman *et al*, 2005; Leucht & Helms, 2014; Nakamura *et al*, 2003; Udagawa *et al*, 2000; Zheng *et al*, 2012). OPG och proteiner tillhörande Wnt-signaleringsvägen kopplas till benvävnadens massa och densitet, vilket torde vara av vikt även för frakturer eftersom porositeten i benvävnaden är en avgörande faktor för uppkomsten (Martig *et al*, 2013). En stressfraktur i det tredje metakarpalbenet påverkar även broskvävnaden i leden och här är BSP av vikt på grund av dess lokalisering i övergången mellan de olika vävnadstyperna (MacKinnon *et al*, 2014; Martig *et al* 2013). Ökad eller minskad koncentration av markörerna kan indikera en obalans i vävnaden och eftersom detta är en stor del i patogenesen för stressfrakturer föreligger tydlig relevans för forskning inom detta område. Benmarkörer är vägen till att en laborativ undersökning kan bli diagnostiserande men också ett verktyg i ett preventivt arbete. Många artiklar nämner denna möjlighet men för att kunna använda detta i praktiken krävs ökad kunskap om specifika markörer; hur de ska tolkas och vilka referensnivåer som ska användas.

Sammanfattning

Syftet med detta arbete var att få en fördjupad kunskap kring patologisk bild vid stressfraktur hos tävlingshästar samt hur potentiella benmarkörer kan hjälpa till i det preventiva och diagnostiska arbetet. Detta syfte är uppnått, och dessutom har en ökad förståelse för benmarkörers stora potential erhållits.

Stressfrakturer hos den elitidrottande hästen idag har en stor påverkan på individen och ger även industrin en ekonomisk belastning. Skadorna är svåra att förebygga; dock överväger vinsterna med en väl fungerande metod för diagnostik och prevention de utmaningar som finns för att utveckla dem! Om man kopplar detta till att man även kan hitta träningsformer som är mer fysiologiska och inte ger en utveckling av patologi i benvävnad bör också humansidan ha nytta av denna forskning då stressfrakturer även förekommer hos elitidrottare (Firth *et al*, 2009). Biologiska markörer för att kunna upptäcka frakturrisik hos humana atleter har inte undersökts, och här har alltså den veterinärmedicinska forskningen en chans att bli världsledande inom området. Resultatet av denna litteraturstudie talar för en stor problematik med stressfrakturer hos den elitidrottande hästen och att behov av säker, icke-invasiv diagnostik och prevention behövs. Biologiska markörer är tänkbara som indikatorer för onormal benvävnad, men idag finns inte relevanta benmarkörer vetenskapligt utprovade. Kanske är BSP, OPG och proteinerna i Wnt-signaleringsvägen vägen dit?

REFERENSER

- Allen, M.J. (2003). Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Veterinary Clinical Pathology*, 32(3), 101-113.
- Boulefour, W., Boudiffa, M., Wade-Gueye, N-M., Bouët, G., Cardelli, M., Laroche, N., Vanden Bossche, A., Thomas, M., Bonnelye, E. Aubin, J.E., Vico, L., Lafage-Proust, M-H. & Malaval, L. (2014). Skeletal development of mice lacking bone sialo protein (BSP) – impairment of long bone growth and progressive establishment of high trabecular bone mass. *PLoS One*, 9(5), 1-13. DOI: 10.1371/journal.pone.0095144.
- Bucay, N., Sarois, I. Dunstan, C.R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H.L., Lacey, D.L., Boyle, W.J. & Simonet, W.S. (1998). Osteoprotegrin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes and development*, 12, 1260-1268.
- Byron, C.R., Barger, A.M., Stewart, A.A., Podenis, H.C. & Fan, T.M. (2010). In vitro expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligande and osteoprotegrin in cultured equine articular cells. *American Journal of Veterinary Research*, 71(6), 615-622.
- Davidson, E.J. & Ross, M.W. (2003). Clinical recognition of stress-related bone injury in racehorses. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2(4), 296-311.
- Dubois, M-S., Morello, S., Rayment, K., Markel, M.D., Vanderby Jr, R., Kalscheur, V.L., Hao, Zhengling., McCabe, R., Marquis, P. & Muir, P. (2014). Computed tomographic imaging of subchondral fatigue cracks in the distal end of the third metacarpal bone in the thoroughbred racehorse can predict crack micromotion in an ex-vivo model. *PLoS One*, 9(7), 1-13. DOI: 10.1371/journal.pone.0101230.
- Dyson, S. (2014). Musculoskeletal scintigraphy of the equine athlete. *Seminars in nuclear Medicine*, 44, 4-14.
- Ekman, S., Skiöldbrand, E., Heinegård, D. & Hultenby, K. (2005). Ultrastructural immunolocalisation of bone sialo protein in the osteocartagenous interface of the equine third carpal bone. *Equine Veterinary Journal*, 37(1), 26-30.
- Estrada, K., Stykarsdottir, U., Evangelou, E., Hsu, Y-H., Duncan, E.L., Ntzani, E.E., Oei, L., Albagha, O.M.E., Amin, N., Kemp, J.P., Koller, D.L., Li, G., Liu, C-T., Minster, R.L., Moayyeri, A., Vandenput, L., Willner, D., Xiao, S-M., Yerges-Armstrong, L.M., Zheng, H-F., Alonso, N., Eriksson, J., Kammerer, C.M., Kaptoge, S.K., Leo, P.J., Thorleifsson, G., Wilson, S.G., Wilson, J.F., Aalto, V., Alen, M., Aragaki, A.K., Aspelund, T., Center, J.R., Dailiana, Z., Duggan, D.J., Garcia, M., Garcia-Giralt, N., Giroux, S., Hellmans, G., Hocking, L.J., Bjerre Husted, L. Jameson, K.A., Khusainova, R., Kim, G.S., Kooperberg, C., Koromila, T., Kruk, M., Laaksonen, M., Lacroix, A.Z., Lee, S.H., Leung, P.C., Lewis, J.R., Masi, L., Mencej-Bedrac, S., Nguyen, T.V., Nogues, X., Patel, M.S., Prezelj, J., Rose, L.M., Scollen, S., Siggeirsdottir, K., Smith, A.V., Svensson, O., Trompet, S., Trummer, O., van Shoor, N.M., Woo, J., Zhu, K., Balcells, S., Brandi, M.L., Buckley, B.M., Cheng, S., Christiansen, C., Cooper, C., Dedoussis, G., Ford, I., Frost, M., Goltzman, D., Gonzáles-Macías, J., Kähönen, M., Karlsson, M., Khusnutdivona, E., Koh, J.M., Kollia, P., Lomholt Langdahl, B., Leslie, W.D., Lips, P., Ljunggren, Ö., Lorenc, R.S., Marc, J., Mellström, D., Obermayer-Pietsch, B., Olmos, J.M., Pettersson-Kymmer, u., Reid, D.M., Riancho, J.A., Ridker, P.M., Rousseau, F., Slagboom, P.E., Tangon, N.L.S., Urreizti, R., van Hul, W., Viikari, J., Zarrabeitia, M.T., Aulchenko, Y.S., Castano-Betancourt, M., Grundberg, E., Herrera, L., Ingvarsson, T., Johannsdóttir, H., Kwan, T., Li, R., Luben, R., Medina-Gómez, C., Palsson, S.T., Reppe, S., Rotter, J.I., Sigurdsson, G., van Meurs, J.B.J., Verlaan, D., Williams, F.M.K., Wood, A.R., Zhou, Y., Gautvik, K.M., Pastinen, T., Raychaudhuri, S., Cauley, J.A., Chasmas,

- D.I., Clark, G.R., Cummings, S.R., Danoy, P., Dennison, E.M., Eastell, R., Eisman, J.A., Gudnason, V., Hofman, A., Jackson, R.D., Jones, G., Jukema, J.W., Khaw, K-T., Lehtimäki, T., Liu, Y., Lorentzon, M., McCloskey, E., Motchell, B.D., Nandakumar, K., Nicholson, G.C., Oostra, B.A., Peacock, M., Pols, H.A.P., Price, R.L., Raitakari, O., Reid, I.R., Robbins, J., Sambrook, P.N., Sham, P.C., Shuldiner, A.R., Tylavsky, F.A., van Duijn, C.M., Wareham, N.J., Cupples, L.A., Econs, M.J., Evans, D.M., Harris, T.B., Kung, A.W.C., Psaty, B.M., Reeve, J., Spector, T.D., Streeten, A.E., Zillikens, M.C., Thorsteinsdottir, U., Ohlsson, C., Karasik, D., Richards, J.B., Brown, M.A., Stefansson, K., Uitterlinde, A.G., Ralston, S.H., Ioannidis, J.P.A., Kiel, D.P. & Rivadeneira, F. (2012). Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nature Genetics*, 44(5), 491-503.
- Firth, E.C., Doube, M. & Boyde, A. (2009). Changes in mineral tissue at the site of origin of condylar fracture are present before athletic training in Thoroughbred horses. *New Zealand Veterinary Journal*, 57(5), 278-283.
- Frisbie, D.D., Mellwraith, C.W., Arthur, R.M., Blea, J., Baker, V.A. & Billingham R.C. (2010). Serum biomarker levels for musculoskeletal disease in two- and three-year-old racing Thoroughbred horses: A prospective study of 130 horses. *Equine Veterinary Journal*, 42(7), 643-651.
- Gaschen, L. & Burba, D.J. (2012). Musculoskeletal injury in Thoroughbred Racehorses. *Veterinary Clinic Equine*, 28: 539-561.
- Goodship, A. & Smith, R. (2004). Skeletal physiology: response to exercise and training. I: Hinchcliff, K., Kaneps, A., Geor, R. & Bayly, W. (red). *Equine sports medicine and surgery*. London: Saunders, 111-129.
- Holmes, J.M., Mirams, M., Mackie, E.J. & Whitton, R.C. (2014). Thoroughbred horses in training have lower levels of subcondral bone remodeling in highly loaded regions of the distal metacarpus compared to horses resting from training. *The Veterinary Journal*, 202, 443-447.
- Khan, K., Brown, J., Way, S., Vass, N., Crichton, K. (1995). Overuse injuries in classical ballet. *Sports Medicine*, 15, 46-48.
- Leucht, P. & Helms, J.A. (2014). WNT signaling: An emerging target for bone regeneration. *Veterinary Clinic Equine*, 28: 539-561.
- Loucks, A. (2008). The evolution of the female Athlete Triad. I: Burke, L. & Deakin, V.(red). *Clinical Sports Nutrition*. North Ryde: McGraw Hill, 227-234.
- MacKinnon, M.C., Bonder, D., Bosteon, R.C. & Ross, M.W. (2014). Analysis of stress fractures associated with lameness in thoroughbred flat racehorses training on different track surfaces undergoing nuclear scintigraphic examination. *Equine Veterinary Journal*, 23, 1-6.
- Martig, S., Lee, P.V.S., Anderson, G.A. & Whitton, R.C. (2013). Compressive fatigue life of subchondral bone of the metacarpal condyle in thoroughbred racehorses. *Bone*, 57, 392-398.
- Matheson, G.O., Clement, D.B., McKenzie, D.C., Taunton, J.E., Lloyd-Smith, D.R. & McIntyre, J.G. (1987). Stress fracture in athletes. A study of 320 cases. *American Journal of Sports Medicine*, 15, 46-58.
- Milgrom, C., Giladi, M., Stein, M., Kashtan, H. & Margulies, Y.E. (1985). Stress fractures in military recruits. A prospective study showing an unusually high incidence. *Journal of Bone Joint Surgery British*, 67, 732-735.
- Movérare-Skrtic, S., Henning, P., Liu, X., Nagano, K., Saito, H., Börjesson, A.E., Sjögren, K., Windahl, S.H., Farman, H., Kindlund, B., Engdahl, C., Koskela, A., Zhang, F-P., Eriksson, E.E.,

- Zaman, F., Hammarstedt, A., Isaksson, H., Bally, M., Kassem, A., Lindholm, C., Sandberg, O., Aspenberg, P., Säwendahl, L., Feng, J.Q., Tuckermann, J., Poutanen, M., Baron, R., Lerner, U.H., Gori, F. & Ohlsson, C. (2014). Osteoblast-derived WNT16 represses osteoclastogenesis and prevent cortical bone fragility fractures. *Nature medicine*, 1-16. DOI: 10.1038/nm.3654.
- Nakamura, M., Udagawa, N., Matsuura, S., Mogi, M., Nakamura, H., Horiuchi, H., Saito, N., Hiraokia, B.Y., Kobayashi, Y., Takaoka, H., Ozawa, H., Miyazawa, H. & Takahashi, N. (2003). Osteoprotegrin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology*, 114(12), 5441-5449.
- Price, J. (2011). Bone biomarkers. I: Ross, M. & Dyson, S. (red). *Diagnosis and management of lameness in the horse*. St Louis; Saunders, 947-952.
- Powell, S.E. (2012). Low-field standing magnetic resonance imaging findings of the metacarpo/metatarsophalangeal joint of racing Thoroughbreds with lameness localized to the region: A retrospective study of 131 horses. *Equine veterinary journal*, 44, 169-177.
- Radtke, C., Danova, N., Scollay, M., Santschi, E., Markel, M., Da Costa Gomea, T & Muir, P. (2003). Macroscopic changes in the distal ends of the third metacarpal and metatarsal bones of Thoroughbred racehorses with condylar fractures. *AJVR*, 64(9), 110-117.
- Ramzan, P.H.L. & Palmer, L. (2011). Musculoskeletal injuries in Thoroughbred racehorses: A study of three large training yards in Newmarket, UK (2005-2007). *The veterinary Journal*, 187, 325-329.
- Sagar, D.R., Ashraf, S., Xu, L., Burston, J.J., Menhinick, M.R., Poulter, C.L., Bennett, A.J., Walsh, D.A. & Chapman, V. (2014). Osteoprotegrin reduces the development of pain behavior and joint pathology in a model in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 73, 1558-1565.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Lüthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombari, A., Tan, H-L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R. & Boyle, W.J. (1997). Osteoprotegrin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89: 309-319.
- Sjaastad, Ø., Sand, O. & Hove, K. (2012). *Physiology of domestic animals*. Oslo: Scandinavian Veterinary Press, 259-270
- Stover, S.M. (2003). The epidemiology of thoroughbred racehorse injuries. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2(4), 312-322.
- Svala, E. (2014). *Inflammation in Equine Articular Cartilage. The effect of cytokines in chondrocyte pellets and explants: Two in vitro models*. Diss. Uppsala: Sveriges Lantbruksuniversitet.
- Thorfve, A. (2014). *Bone and cartilage regeneration. Wnt signaling pathway in healing*. Diss. Göteborg: Göteborgs Universitet
- Udagawa, N., Takahashi, N., Yasuda, H., Mizuno, A., Itoh, K., Ueno, Y., Shinki, T., Gillespie, M.T., Martin, T.J., Higashio, K. & Suda, T. (2000). Osteoprotegrin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*, 141(9), 3478-3484.
- Verheyen, K.L.P., Price, J.S. & Wood, J.L.N. (2009). Exercise during training is associated with racing performance in Thoroughbreds. *The Veterinary Journal*, 181, 43-47.

- Weisman, S.N & Matkovic, V. (2005). Potential use of biochemical markers of bone turnover for assessing the effect of calcium supplementation and predicting fracture risk. *Clinical Therapeutics*, 27 (3), 299-308.
- Zachary, J. & McGavin, D. (2012). *Pathology basis of veterinary disease*. Missouri: Elsevier, 920-971.
- Zheng, H-F., Tobias, J.H., Duncan, E., Evans, D.M., Eriksson, J., Paternoster, L., Yerges-Armstrong, L.M., Lehtimäki, T., Bergström, U., Viikari, J., Ladouceur, M., Lyytikäinen, L-P., Medina-Goez, C., Rivadeneira, F., Price, R.L., Sievanen, H., Leslie, W.D., Mellström, D., Eisman, J.A., Movérare-Skrtic, S., Goltzman, D., Hanley, D.A., Jones, G., St. Pourcain, B., Xiao, Y., Timpson, N.J., Davey Smith, G., Reid, I.R., Ring, S.M., Sambook, P.M., Karlsson, M., Dennison, E.M., Kemp, J.P., Danoy, P., Sayers, A., Wilson, S.G., Nethander, M., McCloskey, E., Vandenput, L., Eastell, R., Liu, J., Spector, T., Mitchell, B.D., Streeten, E.A., Brommage, R., Pettersson-Kymmer, U., Brown, M.A., Ohlsson, C., Richards, J.B. & Lorentzon, M. (2012). WNT16 influences bone mineral density, cortical bone thickness, bone strength, and osteoporotic fracture risk. *PLoS Genetics*, 8(7): ss 1-13. DOI: 10-1371/journal.pgen.1002745.